

〈一般研究課題〉 生体深部の構造と弾性の高空間分解能可視化
技術の開発

助成研究者 名古屋大学 山中 真仁



生体深部の構造と弾性の高空間分解能可視化技術の開発

山中 真仁
(名古屋大学)

Development of a high-resolution imaging technique of tissue structures and elasticity

Masahito Yamanaka
(Nagoya University)

Abstract :

Advancements of sensing, imaging, and analyzing techniques are significantly important for studies in the medical and life science fields. Here, we proposed to develop a high-resolution imaging technique of tissue structures and elasticity by using optical coherence microscopy (OCM) in the 1700 nm spectral band. OCM is an imaging modality based on the combination of optical coherence tomography (OCT) and confocal microscopy, which allows us to perform three-dimensional (3D) high-resolution imaging of tissue specimens in a label-free manner. So far, to observe structures in deep parts of turbid scattering tissue specimens with OCM, the 1300 nm spectral band has been commonly utilized due to the lower scattering coefficient compared with that of shorter near-infrared (NIR) wavelength regions, such as the 800 and 1000 nm wavelength regions. Recently, several groups, including us, reported that the 1700 nm spectral band enables us to improve the imaging depth of OCM/OCT. This is because the scattering coefficient is lower in the 1700 nm spectral band and there is the local minimum in the light absorption coefficient by water. By using the 1700 nm spectral band, we developed an OCM system with the spatial resolution of several μm . In this study, based on this high-resolution OCM system, we developed a technique to realize simultaneous visualization of structures and elasticity in turbid scattering tissues. The tissue elasticity measurement is based on the local displacement measurement, which is induced by external pressure. Our results indicated that, although it is still required to improve

the detection accuracy of local displacement, it is possible to extract the information from the detected OCM signals.

1. はじめに

生体組織の力学的性質はその組織毎に大きく異なり、例えば脳などであれば弾性率は100 Pa程度であるが、骨になると100 kPa以上にもなる。さらに、腫瘍組織の弾性率が周辺の正常組織よりも高くなることも知られている [1,2]。このように、弾性率などの力学的特性は生体組織を特徴づける重要な要素の一つであり、この特徴を詳細に可視化し、解析することで、生体組織の新たな知見が得られるのではと期待されている。

従来、生体組織の観察には、光学イメージング技術が幅広く利用されてきた。これは光学イメージング技術を用いることで、観察対象を高空間分解能かつ非侵襲に観察できるためである。生体組織内部を観察する場合には、生体透過性の高い近赤外波長域の光を用いられている。近赤外イメージング技術の代表例としては多光子励起蛍光顕微鏡が挙げられる。多光子励起蛍光顕微鏡は、試料中の観察ターゲットを蛍光分子や蛍光タンパク質で標識することで高コントラストなイメージングを可能にする蛍光顕微鏡の一種であり、近赤外光を用いた多光子励起を利用することで生体組織深部の3次元高空間分解能観察を実現している。蛍光顕微鏡は観察ターゲットを特異的かつ高いコントラストで可視化できることから、多くの研究分野で利用されている。しかし、近年、蛍光標識によって観察対象の特性が変化してしまうという報告もされており [3-6]、無標識で試料を観察出来る手法の需要が高まっている。

本研究で利用する光コヒーレンス顕微鏡技術(Optical Coherence Microscopy: OCM)は、光コヒーレンストモグラフィと共焦点顕微鏡を組み合わせた光学イメージング技術であり、生体組織試料深部の3次元構造を高い空間分解能かつ化学的な処理(蛍光標識など)を施すことなく可視化できる手法である。OCMなどの光学イメージング技術で生体深部を観察する際には、波長800-1300 nm帯の近赤外光が利用されてきた。近赤外光を用いた場合、生体の観察深度を制限している主な要因は試料中の光散乱と水の吸収による光減衰である。これまで申請者は、光散乱効率が少なく、水の吸収が比較的低い波長1600-1800 nm帯に着目して波長1700 nm帯OCMを開発し、従来の限界を越えるイメージング深度を実現してきた。本研究では、これまで開発を進めてきた波長1700 nm帯OCMをもとに生体試料深部の3次元構造と弾性分布の可視化技術の開発を進めた。

2. 波長1700 nm帯光コヒーレンス顕微鏡をベースとした生体組織深部の構造と弾性計測システム

本研究ではこれまでに開発してきた波長1700 nm帯スペクトル領域OCM(SD-OCM)をベースに生体組織深部の構造と弾性情報のイメージングシステムを構築した。本研究で用いる波長1700 nm帯SD-OCMは、光源として我々の研究グループで開発した波長1700 nm帯ファイバーレーザーベースのスーパーコンティニューム(SC)光源を利用している。このSC光源の中心波長は1720 nm、波長幅300 nm(半値全幅)であり、出力は30 mWである。干渉計測のために、ファイバーカップラを利用したマイケルソン型の低コヒーレンス干渉計を用いている。リファレンスアームには、サンプルアームとリファレンスアームの分散値の違いを補償するための光学ガラスを配置した。サンプルアームは、レーザー走査型共焦点顕微鏡の光学系で構成されており、XY走査用の2軸ガルバノミ

ラー、スキャンレンズ、チューブレンズ、そして対物レンズで構成されている。干渉信号の検出には、分光器とInGaAsラインスキャンカメラを用いた。分光器はZemaxソフトウェアで波長1700 nm帯SD-OCM専用に設計開発したものであり、本研究で用いるSC光源のスペクトル幅を最大限に活かした高空間分解能イメージングが出来る設計となっている。

本研究では生体組織の弾性を計測するために生体組織に微小な外力を印加し、その際に生じる微小変位を計測する。予め弾性率が既知の試料で同様の計測を行っておくことで、生体組織への外力印加時の変位量から弾性率を算出する。生体組織に影響がないほど微小な外力で生じる微小変位はSD-OCMの空間分解能よりも小さいため、そのままSD-OCMで得られる信号強度情報をマッピングしても変位を計測できない。本研究では、SD-OCMで計測する干渉信号の位相情報から空間分解能以下の変位情報の抽出を行う。フーリエ周波数解析を利用することで、位相情報の抽出を行うシステムを開発、導入した。

本研究で開発するシステムでは、試料に微小な圧力を印加した際に生じる干渉信号の位相変化から、試料中の変位を計測することで試料の弾性情報を得る。このためには、干渉信号を計測するSD-OCMシステムの高い安定性が不可欠である。これまでの研究では位相計測に主眼を置いていなかったため、未だ信号計測の安定性が不十分であった。本研究では位相計測時の信号のゆらぎ等を抑制するため、SD-OCMシステムの干渉信号計測部、サンプルアームの光学系、ファイバーで構成している部位の安定性の向上を図った。

3. 弾性情報抽出システムのシミュレーションおよび模擬計測

実際の計測を行う前に、擬似的な干渉波形を生成し、開発した弾性情報抽出システムで変位を計測できるかを確認するためにシミュレーションを行った。開発したシステムは、原理的に位相変化が π から $-\pi$ までの間で正確に位相を計測できるものであり、様々な入力信号条件で得られた結果からもそのことが確認できた(図1)。シミュレーションでの動作確認後、ミラーからの反射光をミラーの位置をピエゾステージで微小に変化させながら計測したところ、変位を計測できていることが確認できたが、50 nm程度の測定誤差が生じていることがわかった(図2)。変位計測の誤差は位相計測の誤差由来であるため、現在、SD-OCMシステムの干渉信号計測部および光源の安定性の向上に取り組んでいる。

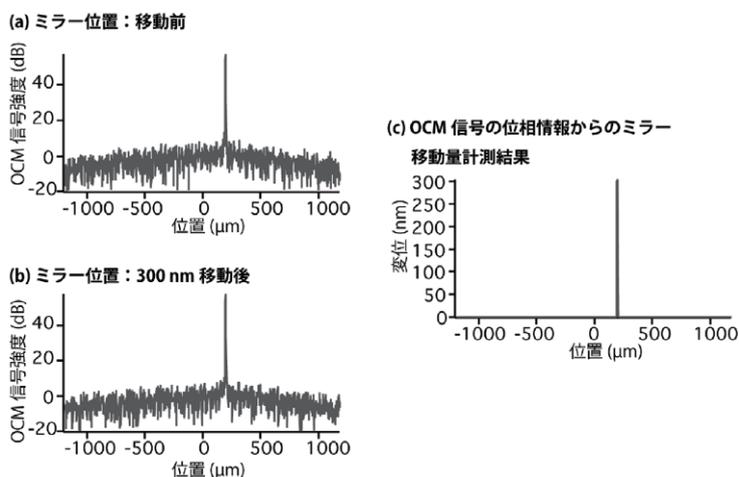


図1. (Simulation) (a) 反射体の移動前の位置で計測したOCM信号と位相、(b) 300 nm移動後のOCM信号と位相、および(c) 変位量抽出結果

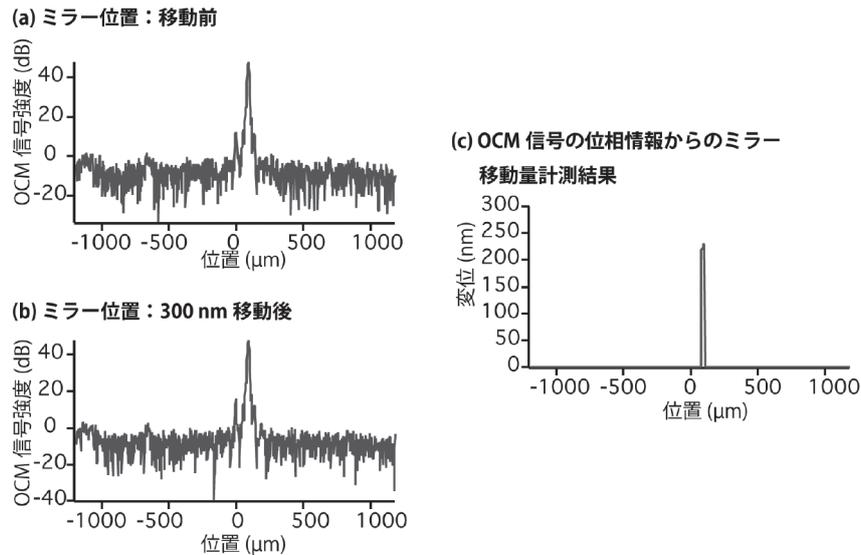


図2. (開発した装置による計測結果)(a)反射体の移動前の位置で計測したOCM信号と位相、(b)300 nm移動後のOCM信号と位相、および(c)変位量抽出結果

4. 弾性情報計測用の生体模擬試料の検討

本研究で開発したSD-OCMシステムによる生体試料の弾性計測能力を評価するため、生体模擬試料の作製に取り組んだ。マトリゲルなどの細胞外マトリックスタンパク質を多く含む可用性基底膜を用いて作製した細胞スフェロイド(細胞の凝集体)を用いて、大型の生体模擬試料を作製し、弾性情報計測に利用することを検討している。今後、細胞スフェロイドから大型細胞ブロックが作製できるネットモールドを利用して、数 mmから1 cm程度の生体模擬試料を作製する予定である。

参考文献

1. C. Alibert, B. Goud, and J. Manneville, "Are cancer cells really softer than normal cells?," *Biol. Cell* **109**, 167-169 (2017)
2. H. Mohammadi and E. Sahai, "Mechanisms and impact of altered tumour mechanics," *Nat. Cell Biol.* **20**, 766-774 (2018)
3. J. Ando, M. Kinoshita, J. Cui, H. Yamakoshi, K. Dodo, K. Fujita, M. Murata, & Mikiko Sodeoka, "Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **112**, 4558-4563 (2015)
4. F. Hu, Z. Chen, L. Zhang, Y. Shen, L. Wei, & W. Min, "Vibrational imaging of glucose uptake activity in live cells and tissues by stimulated Raman scattering," *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 9821-9825 (2015)
5. L. D. Hughes, R. J. Rawle, & S. G. Boxer, "Choose your label wisely: water-soluble fluorophores often interact with lipid bilayers," *PloS one* **9**, e87649 (2014)
6. L. C. Zanetti-Domingues, C. J. Tynan, D. J. Rolfe, D. T. Clarke, & M. Martin-Fernandez, "Hydrophobic fluorescent probes introduce artifacts into single molecule tracking experiments due to non-specific binding," *PloS one* **8**, e74200 (2013)